

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C12N 9/64	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/15374
		(43) 国際公開日 1995年6月8日 (08.06.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02009		添付公開書類 国際調査報告書
(22) 国際出願日 1994年11月30日 (30. 11. 94)		
(30) 優先権データ 特願平5/341061 1993年11月30日 (30. 11. 93) JP		
(71) 出願人 (本国を除ぐすべての指定国について) 富士薬品工業株式会社 「FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA」(JP/JP) 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 Toyama, (JP)		
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (本国についてのみ) 清水元治 (SEIKI, Motoharu) [JP/JP] 〒920 石川県金沢市酒波3丁目10番14号 Ishikawa, (JP) 佐藤 博 (SATO, Hiroshi) [JP/JP] 〒921 石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和宿舎C57-11 Ishikawa, (JP) 品川 朗 (SHINAGAWA, Akira) [JP/JP] 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内 Toyama, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 南 孝夫 (MINAMI, Takao) 〒102 東京都千代田区麹町3丁目2番地 相互第一ビル Tokyo, (JP)		
(81) 指定国 U.S., 欧州特許 (DE, FR, GB, IT)		

(54) Title : NOVEL METALLOPROTEASE AND DNA CODING FOR THE SAME

(54) 発明の名称 新規なメタロプロテアーゼおよびそれをコードするDNA

(57) Abstract

A novel metalloprotease, a DNA coding for the same, a plasmid having the sequence of the DNA, a host cell having the plasmid, and a monoclonal antibody binding specifically to the protein thereof, being useful in the medical and physiological fields for recognizing the presence of a cancer cell, diagnosing cancer malignancy, and other applications.

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

新規なメタロプロテアーゼ、それをコードするDNA、
そのDNA配列を有するプラスミドおよびそのプラスミ
ドを有する宿主細胞ならびにそのタンパク質に特異的に
結合するモノクローナル抗体。

癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等の医学的、
生理学的分野の用途に有用である。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スードアン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	シロヴェニア
BF	ブルガニア・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	イスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴー	IT	イタリー	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジエール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ヴィエトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明細書

発明の名称

新規なメタロプロテアーゼおよび

それをコードするDNA

5 技術分野

本発明は、癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等に、あるいはその他の医学的、生理学的分野の用途に有用な新規なメタロプロテアーゼに関する。

さらに詳しく言えば、本発明はヒト癌細胞で特異的に発現しているメタロプロテアーゼの1種ならびにそれをコードする遺伝子DNA配列、そのDNA配列を含有する塩基配列を有するプラスミド、そのプラスミドを有する宿主細胞、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造方法、前記DNA配列とハイブリダイズするプローブ、該プローブを用いる前記DNA配列を有するDNAまたはRNAの検出方法、前記のタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に関するものである。

背景技術

コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、基質特異性を異にするマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素(以下MMPsと略記する)が関与している。

これまでMMPsとしては、間質型コラゲナーゼ(MMP-1)、25 72kDaゼラチナーゼ(IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナ

ーゼ A ともいう : **MMP-2**)、92kDaゼラチナーゼ(IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナーゼ B ともいう : **MMP-9**)、ストロムライシン-1 (**MMP-3**)、マトリライシン (**MMP-7**)、好中球コラゲナーゼ (**MMP-8**)、ストロムライシン-2 (**MMP-10**)、ストロムライシン-3 (**MMP-11**)等が報告されている。
5

これらの**MMPs**はファミリーを形成し、遺伝子の一次構造は既に報告されている。決定されている**MMPs**ファミリー間の一次構造においては、**MMP-7**を除き各**MMP**は基本的に N-末端プロペプチドドメイン、 Zn^+ 結合触媒ドメイン、C-末端ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。**MMP-7**においてはヘモペキシン凝血酵素様ドメインはない。**MMP-2**と**MMP-9**では、この他にゼラチン結合ドメインを含んでいる。さらに、**MMP-9**では、 Zn^+ 結合触媒ドメインと C-末端ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの間にプロリンに富むV型コラーゲン α 2鎖と相同性の高いドメインが挿入されている。
10
15

転移性の高い癌細胞では、IV型コラーゲンを主たる基質とするIV型コラゲナーゼ (**MMP-2**、**MMP-9**) の顕著な発現が見られることが報告されており (キャンサー リサーチ (Cancer Res.)、第46巻、1~7頁 (1986); バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.)、第154巻、832~838頁 (1988); キャンサー (Cancer)、第71巻、1368~1383頁 (1993))、また、**MMP-9**の活性化が**MMP-3**の作用
20
25

によって引き起こされることが報告されている(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)第267巻、3581~3584頁(1992))。

マトリックスメタロプロテアーゼの発現の程度は、癌の悪性度を診断する指標となる。

発明の開示

本発明者らは新規なマトリックスメタロプロテアーゼ(以下本明細書においてはMT-MMPと記述する)を見出し、その構造分析を行った。

本発明により、下記に記載されるとおり、新規なメタロプロテアーゼタンパク質、そのタンパク質をコードする塩基配列を有するDNA、このDNA塩基配列を有するプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞ならびに上記メタロプロテアーゼタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体が提供される。

1. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。
2. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA。
3. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミド。
4. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されている

タンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。

5. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

5 以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、公知のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)ファミリーのアミノ酸配列から選択した高度に保存されている配列(配列表配列番号3および4)より、配列表配列番号5および6に記載した配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを設計、合成した。該オリゴヌクレオチドプライマーとヒト胎盤cDNAライブラリーを用い、PCR反応を行い、得られたPCR産物の各DNAの塩基配列を決定し、公知のMMPと相同でない配列を有する390b. p. のDNA断片を得た。この390b. p. DNA断片をプローブ10 とし、ヒト胎盤cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、得られた陽性クローンのファージDNA中に組み込まれていたcDNAの塩基配列を決定した。塩基配列は配列表配列番号2に記載の塩基配列である。配列表配列番号2に記載の塩基配列と同一の配列は、GENBANK/EMBL DNA15 Data Base中には存在せず、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。

配列表配列番号2に記載した上記のクローンのcDNAの塩基配列は、3' 非翻訳配列と共に推定582アミノ酸残基のオープンリーディングフレームを有していた。開始コ20 ドンは塩基番号112に位置し、停止コドンは塩基番号25

1858に存在する。このオープンリーディングフレームは、配列表配列番号1に記載した582アミノ酸からなる配列をコードしており、開始コドンのすぐ下流から推定されるシグナル配列が続き、C末端のアミノ酸番号533から562に20個以上の疎水性アミノ酸の連続した膜結合型タンパク質に特徴的な疎水性領域(配列表配列番号7)が存在することが認められた。

図2に示すようにMT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を調査した結果、MT-MMPは公知のMMPファミリーと高い相同性を示した。MMPファミリーで保存されている前駆体と成熟体のプロセッシング部位近傍の配列、および活性部位の配列はMT-MMP中で最も良好に保存されていた。またMT-MMPでは、他のMMPファミリーのアミノ酸配列上には認められない配列表配列番号7に示した疎水性アミノ酸の連続した配列が存在し、膜貫通型タンパク質の構造的特徴を有することから、他のMMPファミリーとは異なる膜結合型のMMPであることが強く示唆された。

MT-MMPのヒト組織中の発現を各種の組織由来Poly(A)RNAに対するノーザンプロット分析により検討した結果、胎盤、肺、腎臓で高い発現をしていることが認められた(図3参照)。また、ヒト肺偏平上皮癌の正常部分および癌部分から抽出したRNAに対しノーザンプロット分析を行った結果、MT-MMPは癌部位で特異的に発現していることが認められた(図4参照)。

なお、本発明のMT-MMPは、抗MT-MMPモノクローナル抗体を用いた免疫沈降や免疫染色実験により遺伝子産物が分泌されることなく細胞膜上に発現されていることが示され、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした5細胞では、MT-MMPの発現に依存したMMP-2の活性化が観察された(ネイチャー(Nature)、第370巻、61~65頁(1994))。

以上述べた本発明者らの研究成果により、本発明により、配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有する新規なマトリックスメタロプロテアーゼタンパク質が10提供される。

また、本発明により配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNA、該DNAを15有し発現し得るプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞が提供される。上記の宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌などの原核細胞宿主、酵母、COS細胞、CHO細胞、3T3細胞などの真核細胞、Sf21などの昆虫細胞等、通常遺伝子組換え技術で用いられる全ての宿主細胞を用いる20ことができる。上記のプラスミドとしては、通常用いられる宿主細胞に応じた発現ベクターを用いることができる。

さらに本発明により、配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNAから転写されるmRNAが提供され25れる。

上記のDNAあるいはRNAとハイブリダイズし、該DNAまたはRNAを特異的に検出するプローブも提供されるが、該プローブは、通常使用される放射性同位元素、酵素などにより標識され、通常のプロッティング分析、In situハイブリダイゼーションで該DNAあるいはRNAと特異的にハイブリダイズし、検出できるものであれば配列表配列番号2に記載した塩基配列の一部を有するものであればよく、どのような塩基配列でもよい。

さらに、本発明は、本発明に係るMT-MMPと特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒトMT-MMPを免疫原として公知の方法、例えばミルシュタインらの方法(ネイチャー(Nature)、第256巻、495～497頁(1975))により製造することができる。この方法において、免疫原としては天然型ヒトMT-MMP、組換えヒトMT-MMPおよびそれらの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等の何れでもよい。

本発明により、本発明に係る新規なMT-MMPのアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAをクローン化し、そのDNAおよびそのDNAにコードされているタンパク質を遺伝子工学的製造することができる。この新規なMT-MMPのcDNAクローンを用いることにより、上記の塩基配列を遺伝子工学的に常用される方法を用いて他のベクターあるいは宿主へのクローン化を行うことができる。また、上記のcDNAの塩基配列

に準拠して適宜、プローブに適したDNAを設計し、調製することができる。さらに、本発明に係わるMT-MMPの遺伝子塩基配列をもとに遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、MT-MMPのアミノ酸配列中に適宜、1
5 個ないしは複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、
転移あるいは付加した如き変異を導入した相当するタン
パク質を製造することができる。メタロプロテアーゼの
共通の特徴である前駆体と成熟体のプロセッシング部位
近傍の配列や活性部位の配列、ドメイン構造、MT-MMPの
10 特徴であるC末端近傍に存在する疎水性アミノ酸の連続
した疎水性領域が維持されていれば、上記の如き誘導体
は全て本発明に包含される。

本発明の前述した種々の態様を利用することにより、
癌細胞の存在の有無、癌の悪性度などの診断用の診断剤
15 あるいは診断方法の用途に、あるいはまた、その他の医学的生理学的分野の用途に適用される種々の技術手段を
提供することができる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本
発明は、これら実施例により限定されるものではない。

20 実施例

実施例 1

新規なメタロプロテアーゼ(MT-MMP)cDNAの単離

(a) cDNAライブラリーの構築

ヒト胎盤組織から全RNAをグアニジン-塩化セシウム
25 法 (バイオケミストリー(Biochemistry)、第18巻、5294

～5299頁(1979))により抽出し、ポリ(A)⁺RNAをオリゴ(dT)－セルロースカラムを使用して精製した。精製したポリ(A)⁺RNAをテンプレート、オリゴ(dT)をプライマーとしてガブラー・ホフマン(Gubler・Hoffman)法(ジーン5(Gene)、第25巻、263～269頁(1983))に従い、cDNAを合成した。T₄DNAポリメラーゼによりcDNAの末端を平滑化した後、EcoR I メチラーゼによりcDNA中に存在するEcoR I サイトをメチル化した。さらにEcoR I リンカー[*d(pG-G-A-A-T-T-C-C)*]とcDNAをT₄DNAリガーゼを用い10連結させた後、EcoR I 消化することにより両末端にEcoR I サイトを有するcDNAを構築した。このcDNAをλgt11のEcoR I サイトにT₄DNAリガーゼを用い連結させた。次にこのcDNAを例えばインビトロパッケージングキット(Amersham)を使用し、インビトロパッケージング15を行い、cDNAライブラリーを構築した。cDNAライブラリーとして市販の例えばヒト胎盤cDNAライブラリー(CLONTECH)を使用することもできる。

(b) 合成オリゴヌクレオチドプライマーの作製

既知のMMPsファミリーのアミノ酸配列の中から、MMPs20ファミリー中で高度に保存されているアミノ酸配列として配列表配列番号3(P-1)および配列番号4に記載した配列(P-2)を選択した。このオリゴペプチドP-1およびオリゴペプチドP-2のそれぞれに対応するオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを設計した。すなわち、オリゴ25ペプチド中に2つ以上のコドンでコードされるアミノ酸

が存在する場合その混合物とし配列表配列番号5(プライマー1)および配列番号6(プライマー2)に記載した配列のごとく設計した。このプライマー1およびプライマー2をDNAシンセサイザModel 392(Applied Biosystems)を使用し、 β -シアノエチルフォスフォアミダイト(β -cyanoethyl phosphoamidite)法により合成した。得られたプライマー1およびプライマー2は10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8で平衡化したニックカラム(Pharmacia)を用い精製した。

10 (c) PCRによる遺伝子増幅

ヒト胎盤由来のcDNAをテンプレート、前項(b)に記載したプライマー1およびプライマー2をプライマーとしてPCR反応(PCRテクノロジー(PCR Technology)63~67頁、ストックトンプレス(Stockton Press))を行った。

15 その結果、390b.p.のPCR産物を得た。得られたPCR産物を適当なプラスミド、例えばpUC 119やpBluescriptにクローニングし、このPCR産物の塩基配列を、蛍光DNAシーケンサModel 373A(Applied Biosystems)、Taqダイプライマーサイクルシークエンシングキット(Applied Biosystems)を使用し決定した。塩基配列を決定した種々のPCR産物の中から既知MMPの塩基配列と相同性のないPCR産物Aを得た。このPCR産物Aを前述の(a)項に記載したヒト胎盤組織cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。プローブの 32 P標識は、
20 25 ランダムプライムドDNAラベリングキット(Boehringer

Mannheim)を使用して行った。

(d) cDNAライブラリーからの新規MMP遺伝子のスクリーニングと塩基配列の決定

前述の(a)に記載した λ gt11中に構築したヒト胎盤
5 cDNAライブラリーを宿主菌大腸菌Y1090に感染させ、プ
ラークを形成させた。すなわち、Y1090株を0.02%マル
トースを含むL培地で1晩培養後、集菌し、10mM MgSO₄
10 に懸濁した。この細胞懸濁液とファージ液を混合し37°C
15分間インキュベートし、ファージを宿主菌に吸着させ
た。これに軟寒天を加え、Lプレート上に広げた(上記
の操作を以後プレーティングと称す)。プレートを42°C
で1晩インキュベートし、プラークを形成させた後、ナ
イロンフィルター(例えば、ハイボンド-N(Amersham))
15 あるいはニトロセルロースフィルター(例えばNATF
(Millipore))をプレート上に置き、約30秒間放置した。
膜を穏やかに剥がしアルカリ変性液(0.1M NaOH、1.5M
NaCl)に30秒間浸した後、中和液(1.5M NaCl含有0.5M
Tris-HCl緩衝液、pH8)に5分間浸した。このフィルタ
ーを2×SSPE(0.36M NaCl、20mM NaH₂PO₄、2mM EDTA)
20 で洗浄した後、風乾した。上述のプラークのフィルター
への転写を繰り返し、少なくとも2枚のフィルターを調
製した。但し、2枚目以降のフィルターとプレートの接
触時間は2分間程度に延長した。このフィルターを80°C
で2時間ベーキングし、DNAを固定した。1つのプレ
25 トから調製した少なくとも2枚のフィルターをそれぞれ

42°C、1時間洗浄液(1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% SDS含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0)で洗浄後、ハイブリダイゼーションバッグ中にフィルターを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液(50% formamide、5×5 Denhardt's溶液(0.2%ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinylpyrrolidone)、5×SSPE、0.1% SDS、100μg/ml熱変性サケ精子DNA)に浸し、42°Cで6～8時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に100°C、5分間加熱変性させた(c)項で記載した³²P標識プローブをプレハイブリダイゼーション溶液に添加し、42°Cで1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを室温で多量の0.1% SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。次にフィルターを0.1% SDS含有1×SSC溶液中に68°C、15分間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム(Kodak XR)と重ね-70°Cで1週間オートラジオグラフィーを行った。X線フィルムを現像し、1枚のプレートからできた2枚のフィルムを重ね、重なるシグナルをマークした。マークしたシグナルに相当するブラークをSM溶液(100mM NaClおよび10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈してプレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、組換え体ファージを得た。

(e) 組換え体λgt11 DNAの調製

25 クローン化したファージをそれぞれプレーティングし

42°C、3時間インキュベートし、続いて37°C、1晩インキュベートした後SM溶液に数滴のクロロホルムを加え室温で30分間放置した。SM溶液と共に上層の軟寒天を搔き取り、遠心分離した。遠心後の上清に終濃度10%になる5 ようにポリエチレングリコールを加え攪拌した後、4°Cで1時間放置した。これを遠心分離し上清を捨て、ファージ粒子を回収した。このファージ粒子をSM溶液に懸濁し、グリセロールグラジェント超遠心分離法（モレキュラークローニング、アラボラトリー マニュアル10 (Molecular cloning, a laboratory manual)、T. マニアスチス(T. Maniatis)他著、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)発行、2.78頁(1989))により精製した。得られたファージをTM溶液に懸濁し、DNase I および15 RNase Aで処理後、20mM EDTA、50μg/ml Proteinase K および0.5% SDSの混合液を加え65°C、1時間インキュベートした。これをフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させた。得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液(10mM EDTA含有10mM Tris-HCl緩衝液、pH8)に溶解した。20

(f) 挿入断片の塩基配列決定

前項(e)で調製したλgt11 DNAをEcoR Iで分解し、挿入断片を分離精製後、ベクター pBluescript (Stratagene)のEcoR I部位にクローニングした。この25 組換え体 pBluescriptで大腸菌NM522 XLI-Blueを形質

転換した。形質転換細胞をF'選択後、ヘルパーファージVCSM13(Stratagene)を感染させ終液培養した。培養液を遠心分離し菌体を除き、これにPEG／NaClを加えファージを沈殿させた。沈殿をTE溶液に懸濁後、1本鎖DNAをフェノール抽出、エタノール沈殿により回収した。この1本鎖DNAの塩基配列を蛍光DNAシーケンサ Model 373A (Applied Biosystems)、Taqダイライマーサイクルシークエンシングキット(Applied Biosystems)を使用し決定した。決定した塩基配列の全長は3403塩基対であり、
5 その配列は配列表配列番号2に記載した。GENBANK／EMBL DNA Data Baseを使用し、配列表配列番号2に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。
10

(g) 遺伝子産物の解析

15 配列表配列番号2に記載した遺伝子塩基配列から予想される配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列の親水、疎水性値をカイト・ドーリトル(Kyte · Doolittle)法(ジャーナル オブ モレキュラーバイオロジー(J. Mol. Biol.)、第157巻、105～132頁(1982))により算出し、図
20 1に示す親水性、疎水性分布図を決定した。配列表配列番号1のアミノ酸533位から562位のC末端領域に膜結合型タンパク質に特徴的な20個以上の疎水性アミノ酸が連続する配列からなる疎水性領域が存在し、その配列を配列表配列番号7に示した。このような疎水性のアミノ酸
25 が連続している配列は、既知のMMPsには見られない配列

である。

配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列を公知のMMPsのアミノ酸配列とその相同性を比較した結果、配列表配列番号1に示したアミノ酸配列は、MMPsファミリーと相同性を示した。特に、MMPsファミリーで非常に高度に保存されている前駆体と活性型の切断部位および活性部位はMT-MMPでもそれぞれ高い保存性を示した（配列表配列番号1、アミノ酸88位～97位およびアミノ酸番号112位～222位）。

10 実施例2 遺伝子発現

(a) 組織での発現

ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、各組織由来のポリ(A)⁺RNAをプロットしてあるメンブレンヒューマンマルチプルティッシュノーザンプロット(CLONTECH)に対し、³²P標識した実施例1(c)項に記載したPCR産物Aをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。3×SSC(0.45M NaCl、0.045M trisodiumcitrate-2H₂O、pH7.0)で湿らせたヒューマンマルチプルティッシュノーザンプロットのフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液(0.75M NaCl、2.5mM EDTA、0.5×Denhardt's溶液、50%Formamideおよび1%SDS含有20mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)中で穏やかに攪拌しながら2～3時間プレハイブリダイズした。次にハイブリダイゼーション溶液(プレハイブリダイゼーション溶液に10%Sodium Dextran、50μg/ml変性サ

ケ精子DNAを加えた溶液)に熱変性したプローブを加え
レハイブリダイゼーション溶液と交換し、43°Cで1晩ハイ
ブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション
完了後、0.1% SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。次に
5 フィルターを0.1% SDS含有1×SSC溶液中に68°C、15分
間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム
(Kodak XR)と重ね、70°Cで1週間オートラジオグラフィーを行った。MT-MMP遺伝子の転写産物のサイズは、何れ
の組織でも4.8kb、であった。現像したX線フィルムをデ
10 ンシットメーターでトレースしシグナルの強度を測定した
結果、MT-MMP遺伝子は、調べた組織中、肺、胎盤、腎臓
で高い発現を認めた。

(b) 癌組織での発現

ヒト肺偏平上皮癌2例それぞれから正常組織と癌組織
15 を採取し、全RNAをグアニジン-塩化セシウム法により
抽出した。10μgの該RNAそれぞれを1%アガロース電気
泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、実施
例1(c)項に記載した³²P標識したプローブを使用して
ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション
20 およびオートラジオグラフィーのトレースは前項
(a)と同様に行った。いずれのヒト肺偏平上皮癌においても癌組織(図4 T参照)での発現が正常組織(図4 N
参照)に比べ有意に高値を示した。

実施例3 モノクローナル抗体の調製

25 (a) 抗原ポリペプチドの調製

配列表配列番号1に記載したMT-MMPのアミノ酸配列中より他のMMPファミリーとの相同性が低い特異的な配列として配列表配列番号8(配列表配列番号1アミノ酸番号160位～173位の配列)、同9(配列表配列番号1アミノ酸番号320位～333位の配列)および同10(配列表配列番号1アミノ酸番号498位～512位の配列)に記載した配列(以下それぞれ添りペプチドA、添りペプチドBおよびポリペプチドCと略記する)を選択した。これらのポリペプチドをペプチド合成機(ペプチドシンセサイザー9600、MilliGen/Bioscience)を用いFmoc-BOP法により合成し、N末端にシステインを導入した。合成した各ペプチドは高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

(b) 各ポリペプチドとキーホールリンベットヘモシアニンの複合体の調製

15 2mgキーホールリンベットヘモシアニン(KLH)を1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解したものと1.85mgN-(ε-maleimidocaproyloxy)succinimideを200μlのジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30℃、30分間反応させた。ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したPD-10(Pharmacia)でゲルろ過した。マレイミドが結合したKLHを分取し、1.5ml以下に濃縮した。マレイミドが結合したKLHに対し50倍モル量の前記(a)で合成した各ポリペプチドを1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したものとをそれぞれ混合し、4℃、20時間インキュベートし、KLH-ポリペプ

チド複合体を調製した。

(c) 抗体産生細胞の調製

前項(b)で調製した3種類のポリペプチドA、ポリペプチドBおよびポリペプチドCとKLHとの複合体それぞれ
5 250 μ gを完全フロインドアジュvantと共に8週令
Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。18日
後に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解した各複合体200
 μ gをそれぞれの初回免疫したマウスに腹腔内投与し、
追加免疫した。さらに32日後に追加免疫時と同様に各複
10 合体100 μ gを静脈内投与し、最終免疫とした。その3日
後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

(d) 細胞融合

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2(SP2/0-Ag
14)との融合は、オイ(Oi)らの方法(Selected Method
15 メソッド イン セルラー イムノロジー(Selected Method
in Cellular Immunology)、B. B. Mishell and S. M.
シーギ編(ed. B. B. Mishell and S. M. Shiigi)、W. H.
フリーマン アンド カンパニー(W. H. Freeman and
Company)発行、351~372頁(1980))を若干改変して行
20 った。以下では、ポリペプチドA-KLH複合体で免疫した
マウス由来の有核脾細胞とミエローマ細胞SP2との融合
に関して詳述する。

前項(c)で調製した有核脾細胞(生細胞率100%)それ
ぞれとミエローマ細胞(生細胞率100%)とを5:1の比
25 率で以下の手順で融合した。ポリペプチドA脾細胞懸濁

液とミエローマ細胞をそれぞれ RPMI1640 培地で洗浄した。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞 3×10^8 個とミエローマ細胞 6×10^7 個を混合した。次に遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去した。沈殿した細胞に 37°C に加温した PEG4000 溶液 (50% (w/v) ポリエチレングリコール 4000 含有 RPMI1640 培地) 2.0 ml を 1 分間で滴下し、1 分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させた。次に 37°C に加温した RPMI1640 培地 2.0 ml を 1 分間で滴下した。この操作をさらに 1 回繰り返した後、同培地 14 ml を 2 ~ 3 分間で常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させた。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。次にこの沈殿した細胞に 37°C に加温した NS-1 培地 (除菌ろ過した 15% (w/v) 仔牛胎児血清 (JRH Biosciences) 含有 RPMI1640 培地) 30 ml を速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くピッティングで分散した。さらに同培地 30 ml を加えて希釈し、ポリスチレン製 96 穴マイクロウェルにウェル当たり 6.0×10^5 個 / 0.1 ml の細胞を加えた。細胞を加えた上記マイクロウェルを 7% 炭酸ガス / 93% 空気中で温度 37°C 、湿度 100% で培養した。

20 ポリペプチド B - KLH 複合体で免疫したマウス由来脾細胞の場合では、脾細胞 6.4×10^8 個とミエローマ細胞 1.28×10^8 個を混合し、上記で使用した PEG4000 溶液、RPMI1640 培地、NS-1 培地をそれぞれ 4.3 ml 、 38.7 ml 、 129 ml 用いた。ポリペプチド C - KLH 複合体で免疫したマウス由来の脾細胞の場合、脾細胞 6.8×10^8 個とミエローマ

細胞 1.36×10^8 個を混合し、PEG4000溶液、RPMI1640培地、NS-1培地をそれぞれ 4.5 ml 、 40.5 ml 、 135 ml 使用した。

(e) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

前項(d)の培養開始後翌日(1日目)、細胞にパストーリルピペットでHAT培地(NS-1培地にヒポキサンチン($100 \mu \text{M}$)、アミノブテリン($0.4 \mu \text{M}$)およびチミジン($16 \mu \text{M}$)を加えた培地)2滴(約 0.1 ml)を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分(約 0.1 ml)を新しいHAT培地で置き換え、11日目に培地の半分を新しいHT培地(アミノブテリン不含HAT培地)で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウェルについて固相-抗体結合テスト法(ELISA)により陽性ウェルを調べた。すなわち、ポリスチレン性96穴プレートを抗原としたポリペプチドA、BおよびCそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS(0.05% Tween20含有)を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウェルの未コート部分を1%BSAでブロックした。この各ウェルにハイブリドーマの生育が確認されたウェルの上清 0.1 ml を添加し、室温で約1時間静置した。

20 2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とオーフェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。

(f) ハイブリドーマのクローニング

前項(e)で得られた各抗原ペプチドに対する陽性ウェル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローン化した。すなわち、96穴マイクロウェルにハイブリドーマをウェル当たり5個、1個、0.5個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5日目、12日目に全ウェルに約0.1 μ lのNS-1培地を追加した。クローニング開始後約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウェルが50%以上である群について(e)に記載したELISAを行った。調べた全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル中のコロニー数が1個のウェルを4~6個選択し、再クローニングを行った。最終的に表1および表2にまとめて示したように各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがそれぞれ12個、20個、9個得られた。

(g) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られた各ハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、20その上清から濃度10~100 μ g/ ml のモノクローナル抗体を得ることができた。また、得られたハイブリドーマを10⁷個を予め1週間前にブリストンを腹腔内投与したマウス(BALB/c系、雌、6週齢)に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7 μ g/ ml のモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。得られた腹水

を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィゲル(Bio-Rad)に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液(pH 5)で溶出することにより精製した。

5 (h) モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定

前述したELISAに従い、各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCをコートしたマイクロタイトレーションプレートに、(f)で得られたモノクローン10の上清を加えた。次にPBSで洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab.)を加えた。PBSにより洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノージ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いて15クラス、サブクラスを決定した。

(i) 抗MT-MMPモノクローナル抗体の特異性

ヒト新生児線維芽細胞(NB1RGB)の培養上清中からそれぞれ精製した潜在型MMP-1(クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta)、第219巻、1~14頁(1993))、潜在型MMP-2(クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta)、第221巻、91~103頁(1993))および潜在型MMP-3(クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta)、第211巻、59~72頁(1992))、ヒト直腸癌細胞(Car-1)の培養上清から精製した潜在型MMP-7(キャンサー リサーチ(Cancer Res.)、25第50巻、7758~7764頁、(1990))、ヒト好中球より精製

した潜在型MMP-8(バイオロジカルケミストリー ホップセイラー(Biol. Chem. Hoppe-Seyler)、第371巻、サブルメント、295~304頁、(1990))並びにヒト線維芽細胞腫株(HT1080)の培養上清から精製した潜在型MMP-9(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem)、第267巻、21712~21719頁、(1992))をそれぞれ抗原として使用し、前述の(e)に記載したELISAによりヒトMT-MMPペプチドと陽性反応を示す5種類の抗MT-MMPモノクローナル抗体(モノクローン番号113-5B7、113-15E7、114-1F1、114-2F2および118-3B1)の交差反応性を調べた。

すなわち、ポリスチレン製96穴プレートを使用し、各ウエルに精製した各MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8およびMMP-9をそれぞれ50ng/Wellで加えコートした。洗浄用PBSで洗浄し未吸着の抗原を除去した後、各ウエルの未コート部分を3%スキムミルク含有PBSでブロックした。この各ウエルに各抗MT-MMPモノクローナル抗体それぞれを1μg/Wellで加え、室温で約1時間静置した。プレートを洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加えさらに室温で約1時間反応させた。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。

25 その結果、表3に示したように、抗MT-MMPモノクロ-

ナル抗体は何れも、供試したNT-MMP以外の精製MMPsと反応性を示さなかった。

表 1

	<u>ポリペプチド</u>	<u>モノクローン番号</u>	<u>サブクラス/鎖</u>
5	A	114-1F2	$\gamma 1/\kappa$
		114-2F2	$\gamma 1/\kappa$
		114-3H7	$\gamma 1/\kappa$
		114-5E4	$\gamma 1/\kappa$
		114-6G6	$\gamma 1/\kappa$
		114-8D10	$\gamma 1/\kappa$
		114-9H3	μ/κ
		114-15E8	$\gamma 1/\kappa$
		114-16C11	$\gamma 1/\kappa$
		114-18E4	$\gamma 1/\kappa$
10		114-19F11	$\gamma 1/\kappa$
		114-20H5	μ/κ
		113-1E3	$\gamma 3/\kappa$
		113-2E9	$\gamma 3/\kappa$
		113-3F6	$\gamma 2b/\kappa$
15	B	113-4H7	$\gamma 3/\kappa$
		113-5B7	$\gamma 3/\kappa$
		113-7C6	$\gamma 2b/\kappa$
		113-9G9	$\gamma 3/\kappa$
		113-10F2	$\gamma 3/\kappa$
		113-13G11	$\gamma 3/\kappa$
		113-15E7	$\gamma 3/\kappa$
		113-16H8	$\gamma 3/\kappa$
		113-17G12	μ/κ
		113-19A10	μ/κ
20		113-20G11	$\gamma 3/\kappa$
		113-21H3	$\gamma 1/\kappa$
		113-26D3	μ/κ
		113-44C1	$\gamma 1/\kappa$
		113-46B7	$\gamma 1/\kappa$
		113-53G5	μ/κ
		113-63E8	$\gamma 1/\kappa$
25			

表 2

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス／鎖
C	118-3B1	γ 2b/ κ
	118-6F3	γ 2b/ κ
	118-8D11	γ 1/ κ
	118-9B11	γ 1/ κ
	118-13D11	α / κ
	118-18C12	γ 1/ κ
	118-20A3	γ 2b/ κ
	118-25C3	γ 1/ κ
	118-26F5	γ 3/ κ

表 3

モノクローン 番 号	交 差 反 応 性					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9
113-5B7	—	—	—	—	—	—
113-15E7	—	—	—	—	—	—
114-1F2	—	—	—	—	—	—
114-2F2	—	—	—	—	—	—
118-3B1	—	—	—	—	—	—

— : 反応せず

20

25

実施例 4 遺伝子産物の発現と同定

実施例 1 (f) で構築した MT-MMP 遺伝子をクローニングした組換え pBluescript から EcoR I 切断により挿入断片を切出し、真核細胞用発現ベクター pSG5 (Stratagene) の 5 EcoR I サイトにクローニングした。該組換え pSG5 をヒト線維芽細胞腫株 HT1080 にリン酸カルシウム法によりトランスクレクションした。すなわち、蒸留水に 20 μ g の組換え pSG5、6.2 μ l の 2 M CaCl_2 を加え、次に 2 × HBSP 溶液 (1.5 mM Na_2HPO_4 、10 mM KCl 、280 mM NaCl および 12 mM 10 Glucose 含有 50 mM HEPES 緩衝液、pH 7.1) をチューブの底に加え全量が 1 ml になるようにした。これを混合後、室温で 30 分程度放置し、沈殿形成を十分行った。沈殿をピッティングにより分散し、HT1080 細胞に滴下した後、 CO_2 インキュベーター 中で約 4 時間インキュベートした。

15 次に培地を除き、15% グリセリン溶液を加え 1 ~ 3 時間処理した後、グリセリンを吸引除去、PBS で洗浄後、 ^{35}S - メチオニンを含む新鮮な培地を加えた。培養を継続し、細胞タンパク質を ^{35}S で標識した。因みに、HT1080 細胞における MT-MMP 遺伝子の発現はノーザンプロット分析では検出できない。

20

細胞を溶解緩衝液 (1% Triton X-100、1% bovine hemoglobin、1 mM iodoacetamide、0.2 U trypsin inhibitor、1 mM PMSF および 0.14 M NaCl 含有 0.01 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8) 中で 4 °C、1 時間インキュベートした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上

25

清に実施例 3 で得られたモノクローナル抗体をカップリングさせたセファロース-4B(Pharmacia) を加え、4 °C で 2 時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行った。免疫沈降には実施例 3 で得られたポリペプチド A に対する 12 個のモノクローナル抗体のうち非特異的反応性の低いモノクローン番号 114-1F2 および 114-2F2 (受託番号 FERM BP-4743) の 2 種類をそれぞれ使用した。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4B を沈殿させ、洗浄液 (1 % Triton X-100、1 % bovine hemoglobin および 0.14M NaCl 含有 0.01M Tris-HCl、pH 8) で 3 回洗浄し、最後に 0.05M Tris-HCl 緩衝液、pH 6.8 で洗浄した。この洗浄したモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4B に SDS ポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液を加え、100 °C で 5 分間加熱した後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動後のゲルを X 線フィルム (Kodak XR) と重ね -70 °C で 1 週間オートラジオグラフィーを行った後、現像した X 線フィルムをデンシトメーターでトレースしシグナルの強度を測定した。使用した抗 MT-MMP モノクローナル抗体 モノクローン番号 114-1F2 および 114-2F2 はいずれも、63 kDa のタンパク質を免疫沈降した。対照とした MT-MMP 遺伝子を含まないベクター-pSG5 のみをトランスフェクションした細胞では、抗 MT-MMP モノクローナル抗体 モノクローン番号 114-1F2 および 114-2F2 で 63 kDa タンパク質は免疫沈降されなかった。

免疫沈降で検出されたタンパク質の分子量63kDaは、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列から算出される分子量65.78kDaとほぼ一致した。さらに、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列のアミノ酸13位から101位5までを欠失した変異体MT-MMP発現プラスミドを作成し、前述と同様HT1080細胞にトランスフェクションし、免疫沈降を行った。変異体MT-MMP遺伝子を導入したHT1080細胞では、63kDaタンパク質は検出されず、55kDaタンパク質を検出した。この分子量は、導入した欠失から予想される分子量と一致した。

実験例

(a) MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化

実施例4で構築したMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独15を同じく実施例4に記載したリン酸カルシウム法によりHT1080細胞、あるいはマウス胎児由来線維芽細胞NIH3T3にトランスフェクションした。ただし、³⁵S-メチオニン含有新鮮培地の代わりに、通常の新鮮培地を使用した。なお、HT1080細胞およびNIH3T3細胞は、何れも潜在型MMP-2および潜在型MMP-9を分泌しており(図6中の66kDaおよび97.4kDaのバンドにそれぞれ相当)、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした細胞では、MT-MMPが発現していることを免疫沈降実験により確認した(実施例4参照)。

25 得られたトランスフェクタントを無血清培地中で24時

間培養し、回収した培養上清をザイモグラフィーに供試した。培養上清を SDSポリアクリルアミド電気泳動用緩衝液(非還元)と混和後 4 °Cで一晩放置した後、1 mg/ml のカゼイン含有10%ポリアクリルアミドゲルを用い、電流20mA、4 °Cで電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを 2.5% Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩衝液(5 mM CaCl₂、1 μM ZnSO₄含有Tris-HCl、pH7.6)で15分間ゆっくり振盪させながら洗浄し、この操作を2回繰り返した。次にゲルを 1% Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩衝液中に浸し、37°Cで一晩放置した。緩衝液を廃棄し、ゲルを0.02%クマシーブリリアントブルーR(50%メタノール-10%酢酸に溶解)で1時間染色後、脱色液(5%メタノール-7.5%酢酸)に浸し脱色した。

図6に示すように、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたHT1080細胞では、新たに64kDaと62kDaのバンドが生じ、潜在型MMP-2の活性化が確認された。この活性型MMP-2は、細胞を100 μg/mlのコンカナバリンAで処理して誘導される活性型MMP-2分子と同じ分子量を示し、また抗MMP-2モノクローナル抗体と特異的に反応した。

この活性化は、ベクター単独をトランスフェクションしたコントロールでは観察されなかった。一方、潜在型MMP-9は、コントロールの細胞と同様に分子量の変化は認められず、活性化は認められなかった。このMT-MMPの発現に伴う潜在型MMP-2の活性化は、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたNIH3T3細胞でも観察された。

(b) MT-MMP発現細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化

前項(a)の記載と同様にMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5
 5 単独をリン酸カルシウム法によりアフリカミドリザル腎由来細胞COS-1にトランスフェクションした。得られたトランスフェクタントからストロンジン(Strongin)らの方法(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)、第268巻、14033~14039頁(1993))
 10 に従い、細胞膜画分を調製した。

トランスフェクタントをPBSで洗浄後、遠心により細胞を集め8.5% Sucrose、50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10 μ g/ml aprotinin、1 μ g/ml pepstatin A、1 μ g/ml leupeptin、1mM phenyl-
 15 methylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)に懸濁した。細胞懸濁液をDounce homogenizerで破碎し、破碎液を遠心分離(3000 \times g、10分間、4℃)した。得られた上清をさらに超遠心分離(100,000 \times g、2時間)し、沈殿を50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10 μ g/ml aprotinin、1 μ g/ml pepstatin A、1 μ g/ml leupeptin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)に懸濁した。この懸濁液を段階的ショ糖密度勾配遠心(20、30、50、60% Sucrose溶液、100,000 \times g、2時間、4℃)で分画し、
 20 25 生じた細胞膜画分のバンドを回収した。この画分を再度

超遠心分離(100,000×*g*、2時間)により沈殿させた後、0.1M CaCl_2 、0.25% Triton X-100含有25mM HEPES/KOH(pH7.5)に懸濁し、タンパク質終濃度1～2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調整した。この懸濁液を超遠心分離(100,000×*g*、1.5時間、4℃)し不溶残渣を除き得られた上清を細胞膜画分とした。

ベクターpSG5単独またはMT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたCOS-1細胞および無処理のCOS-1細胞からそれぞれ調製した細胞膜画分(タンパク質含量20 μg)を10 HT1080細胞の培養上清と37℃で2時間インキュベートした。これら試料を用いて前項(a)に記載したザイモグラフィーを行った。

その結果、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたCOS-1細胞由来の細胞膜画分を用いた場合のみ、新たに15 64kDaと62kDaのバンドが出現し、HT1080細胞の培養上清中に存在する潜在型MMP-2の活性化が観察された(図7参照)。この潜在型MMP-2の活性化は、組換えTIMP-2の添加により阻害された。この結果から、細胞膜上に発現したMT-MMPによる潜在型MMP-2の活性化が示された。

20 (c) In vitroにおけるMT-MMP発現による浸潤能の促進

細胞の浸潤能の測定は、ボイデン チャンバー(Boyden Chamber)法(キャンサー リサーチ(Cancer Res.)、第47巻、3239～3245頁(1987))を改変して行い、操作はバイ25 オコート マトリゲル インベージョン チャンバー

(Becton Dickinson)の操作方法に従った。

前述の(a)の記載と同様にMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独をリン酸カルシウム法によりHT1080細胞、あるいはNIH3T3細胞にトランスフェクションした。これらの宿主細胞はいずれも潜在型MMP-2を分泌している。得られたトランスフェクタントを0.1% BSA含有DMEM培地に懸濁し、 2×10^5 個の細胞をバイオコートマトリゲルインベージョンチャレンバー中の未コードフィルター(ポアサイズ8μm)あるいは予め膨潤させたマトリゲルコートフィルター上に接種した。24時間、37°C炭酸ガスインキュベーター中に培養した後、フィルターを10秒間メタノール中に浸し固定した。次にヘマトキシリンで3分間水洗後、エオジンで10秒間染色し、フィルター下面に浸潤した細胞数を光学顕微鏡下(400倍)で計測した。

MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたHT1080細胞およびNIH3T3細胞では、いずれもコントロールのベクター単独をトランスフェクションした細胞に比べ、2倍以上の浸潤した細胞が観察された(図8 マトリゲル参照)。すなわち、MT-MMPの発現により細胞の浸潤能が上昇したことが示された。また、この測定系に $10 \mu g/ml$ の組換えTIMP-2を添加すると明らかに細胞の浸潤能が抑制されることが認められた(図8 マトリゲル+rTIMP-2参照)。

図面の簡単な説明

図1は、MT-MMPのアミノ酸配列のカイト・ドーリトル法による親水性、疎水性分布図である。

図2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G、2H
5 は、MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同意を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、
10 HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A～2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

図3は、ノーザンプロット分析による各種のヒト組織
15 中でのMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

図4は、ノーザンプロット分析によるヒト肺偏平上皮癌2例の正常部および癌部におけるMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

20 図5は、MT-MMP cDNA導入HT1080細胞中で発現したMT-MMPタンパク質を免疫沈降法により検出した結果を示したものである。図はデンシトメータによるスキャンを示したものであり、黒塗り部分が抗MT-MMPモノクローナル抗体で免疫沈降したMT-MMPの位置を示す。

25 図6は、MT-MMP cDNA導入HT1080細胞およびMT-MMP

cDNA導入 NIH3T3細胞の培養上清のザイモグラフィーにより、MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化を示したものである。

5 図7は、MT-MMP cDNA導入 COS-1細胞の細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化をザイモグラフィーにより示したものである。

図8は、MT-MMPの発現による細胞の浸潤能の促進を一部改変したボイデン チャンバー(Boyden Chamber)法により示したものである。

10

15

20

25

【配列表 1】

配列番号：1

配列の長さ：582

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖上

配列の種類：タンパク質

配列

Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Arg	Cys	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu
1														
Leu	Thr	Leu	Gly	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser
20														
Ser	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Ala	Trp	Leu	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu
35														
Pro	Pro	Gly	Asp	Leu	Arg	Thr	His	Thr	Gln	Arg	Ser	Pro	Gln	Ser
50														
Leu	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Met	Gln	Lys	Phe	Tyr	Gly	Leu	Gln
65														
Val	Thr	Gly	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Met	Lys	Ala	Met	Arg	Arg
80														
Pro	Arg	Cys	Gly	Val	Pro	Asp	Lys	Phe	Gly	Ala	Glu	Ile	Lys	Ala
95														
Asn	Val	Arg	Arg	Lys	Arg	Tyr	Ala	Ile	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Gln
110														
His	Asn	Glu	Ile	Thr	Phe	Cys	Ile	Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Lys	Val
125														
Gly	Glu	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Ala	Ile	Arg	Lys	Ala	Phe	Arg	Val
140														
Trp	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Phe	Arg	Glu	Val	Pro	Tyr	Ala
155														
160														
165														

【配列表 2】

配列番号：1 (つづき)

Tyr Ile Arg Glu Gly His Glu Lys Gln Ala Asp Ile Met Ile Phe
 170 175 180
 Phe Ala Glu Gly Phe His Glu Asp Arg Thr Ala Phe Asp Gly Glu
 185 190 195
 Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Asn Ile Gly
 200 205 210
 Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Ala Glu Pro Trp Thr Val Arg Asn
 215 220 225
 Glu Asp Leu Asn Gly Asn Asp Ile Phe Leu Val Ala Val His Glu
 230 235 240
 Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala
 245 250 255
 Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Trp Met Asp Thr Glu Lys Phe Val
 260 265 270
 Leu Pro His Tyr Asp Pro Arg Gly Ile Gln Gln Leu Tyr Gly Gly
 275 280 285
 Lys Gln Gly Ser Pro Pro Arg Cys Pro Leu Asn Pro Gly Leu Pro
 290 295 300
 Pro Gly Leu Leu Phe Leu Ile Asn Pro Lys Asn Pro Thr Tyr Gly
 305 310 315
 Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg
 320 325 330
 Gly Glu Met Phe Asp Phe Lys Lys Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg
 335 340 345
 Asn Asn Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe
 350 355 360
 Trp Arg Gly Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys
 365 370 375

[配列表3]

配列番号：1 (つづき)

Asp	Gly	Lys	Phe	Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Asp	Lys	His	Trp	Val	Phe
380									385					390
Asp	Glu	Ala	Ser	Leu	Glu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	His	Ile	Lys	Glu
395									400					405
Leu	Gly	Arg	Gly	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Ile	Asp	Ala	Ala	Leu	Phe
410									415					420
Trp	Met	Pro	Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Phe	Phe	Arg	Gly	Asn	Lys	Tyr
425									430					435
Tyr	Arg	Phe	Asn	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Ser	Glu	Tyr	Pro
440									445					450
Lys	Asn	Ile	Lys	Val	Trp	Glu	Gly	Ile	Pro	Glu	Ser	Pro	Arg	Gly
455									460					465
Ser	Phe	Met	Gly	Ser	Asp	Glu	Val	Phe	Thr	Tyr	Phe	Tyr	Lys	Gly
470									475					480
Asn	Lys	Tyr	Trp	Lys	Phe	Asn	Asn	Gln	Lys	Leu	Lys	Val	Glu	Pro
485									490					495
Gly	Tyr	Pro	Lys	Ser	Ala	Leu	Arg	Asp	Trp	Met	Gly	Cys	Pro	Ser
500									505					510
Gly	Gly	Arg	Pro	Asp	Glu	Gly	Thr	Glu	Glu	Glu	Thr	Glu	Ile	
515									520					525
Ile	Ile	Glu	Val	Asp	Glu	Glu	Gly	Gly	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	
530									535					540
Ala	Val	Val	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Val
545									550					555
Gly	Leu	Ala	Val	Phe	Phe	Phe	Arg	Arg	His	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg
560									565					570
Leu	Leu	Tyr	Cys	Gln	Arg	Ser	Leu	Leu	Asp	Lys	Val			
575									580					

〔配列表 4 〕

配列番号：2

配列の長さ：3403

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト

組織の種類：胎盤

【配列表5】

配列番号：2（つづき）

AGTTCACTGCCTACC	GAAGACAAAGGGCCC	CCGAGGGACTGGCCC	TGCCACCCCAGGGCC	60
TGGGCCCCGGCCGCGG	AGCCACACTGCCCGG	CTGACCCGGTGGTCT	CGGACCATGTCTCCC	120
			MetSerPro	
			/	
GCCCCAAGACCCCTCC	CGTTGTCTCCTGCTC	CCCCTGCTCACCGCTC	GGCACCGCGCTCGCC	180
AlaProArgProSer	ArgCysLeuLeuLeu	ProLeuLeuThrLeu	GlyThrAlaLeuAla	
5	10	15	20	
TCCCTCGGCTCGGCC	CAAAGCAGCAGCTTC	AGCCCCGAAGCCTGG	CTACAGCAATATGGC	240
SerLeuGlySerAla	GlnSerSerSerPhe	SerProGluAlaTrp	LeuGlnGlnTyrGly	
25	30	35	40	
TACCTGCCTCCCGGG	GACCTACGTACCCAC	ACACAGCGCTCACCC	CACTCACTCTCAGCG	300
TyrLeuProProGly	AspLeuArgThrHis	ThrGlnArgSerPro	GlnSerLeuSerAla	
45	50	55	60	
GCCATCGCTGCCATG	CAGAAGTTTACGGC	TTGCAACTAACAGGC	AAAGCTGATGCCAGAC	360
AlaIleAlaAlaMet	GlnLysPheTyrGly	LeuGlnValThrGly	LysAlaAspAlaAsp	
65	70	75	80	
ACCATGAAGGCCATG	AGGGCCCCCGATCT	GCTGTTCCAGACAAG	TTTGGGCGCTGAGATC	420
ThrMetLysAlaMet	ArgArgProArgCys	GlyValProAspLys	PheGlyAlaGluIle	
85	90	95	100	
AAGGCCAATCTTCCA	AGGAAGCGCTACCCC	ATCCAGGGCTCTCAA	TGCCAACATAATGAA	480
LysAlaAsnValArg	ArgLysArgTyrAla	IleGlnGlyLeuLys	TrpGlnHisAsnGlu	
105	110	115	120	
ATTACTTCTGCATC	CAGAATTACACCCCC	AAGCTGGCGAGTAT	GCCACATACGAGGCC	540
IleThrPheCysIle	GlnAsnTyrThrPro	LysValGlyGluTyr	AlaThrTyrGluAla	
125	130	135	140	
ATTCGCAAGGGCGTTC	CGCGCTGGGAGACT	GCCACACCACTGCCG	TTCCGGGAGGTGCC	600
IleArgLysAlaPhe	ArgValTrpGluSer	AlaThrProLeuArg	PheArgGluValPro	
145	150	155	160	
TATGCCTACATCCGT	GAGGGCCATGAGAAG	CAGGCCGACATCATG	ATCTTCTTGGCGAG	660
TyrAlaTyrIleArg	GluGlyHisGluLys	GlnAlaAspIleMet	IlePhePheAlaGlu	
165	170	175	180	

〔配列表 6 〕

配列番号：2（つづき）

GGCTTCCATGGCCAC	ACGACGCCCTTCGAT	GCTGAGGGCGGCTTC	CTGGCCCATGCCTAC	720
GlyPheHisGlyAsp	ArgThrAlaPheAsp	GlyGluGlyGlyPhe	LeuAlaHisAlaTyr	
185	190	195	200	
TTCCCAGGGCCCAC	ATGGAGGAGACACC	CACTTTGACTCTGCC	GAGCCTTGGACTGTC	780
PheProGlyProAsn	IleGlyGlyAspThr	HisPheAspSerAla	GluProTrpThrVal	
205	210	215	220	
AGGAATGAGGATCTG	AATGGAATGACATC	TTCCCTGGTGGCTGTG	CACGAGCTGGGCCAT	840
ArgAsnGluAspLeu	AsnGlyAsnAspIle	PheLeuValAlaVal	HisGluLeuGlyHis	
225	230	235	240	
GCCCTGGGCTCGAG	CATTCCACTGACCCC	TCGGCCATCATGGCA	CCCTTTTACCAAGTGG	900
AlaLeuGlyLeuGlu	HisSerSerAspPro	SerAlaIleMetAla	ProPheTyrGlnTrp	
245	250	255	260	
ATGGACACGGAAAAA	TTTGTGTTCCCCAT	TATGACCCCCGGGGC	ATCCACCAACTTAT	960
MetAspThrGluLys	PheValLeuProHis	TyrAspProArgGly	IleGlnGlnLeuTyr	
265	270	275	280	
GGGGCTAACCAACGT	TCCCCACCAAGATCC	CCCCTCAACCCAGGA	CTACCTCCGGCCCTT	1020
GlyGlyLysGlnGly	SerProProArgCys	ProLeuAsnProGly	LeuProProGlyLeu	
285	290	295	300	
CTGTTCTGATAAAC	CCCAAAACCCACC	TATGGGCCAACATC	TGTGACGGGAACCTT	1080
LeuPheLeuIleAsn	ProLysAsnProThr	TyrGlyProAsnIle	CysAspGlyAsnPhe	
305	310	315	320	
GACACCGTGGCCATG	CTCCGAGGGAGATG	TTTACTTCAAGAAG	CCCTGGTTCTGGGG	1140
AspThrValAlaMet	LeuArgGlyGluMet	PheAspPheLysLys	ArgTrpPheTrpArg	
325	330	335	340	
GTGAGGAATAACCAA	GTGATGGATGGATAC	CCAATGCCATTGGC	CAGTTCTGGGGGGC	1200
ValArgAsnAsnGln	ValMetAspGlyTyr	ProMetProlleGly	GlnPheTrpArgGly	
345	350	355	360	
CTGCCTGGTCCATC	AACACTGCCAACGAG	AGGAAGGATGCCAAA	TTCGTCTTCTTCAAA	1260
LeuProAlaSerIle	AsnThrAlaTyrGlu	ArgLysAspGlyLys	PheValPhePheLys	
365	370	375	380	
GGAGACAAGCATTGG	GTCTTGATGAGGCC	TCCCTGGAACCTGGC	TACCCCAAGCACATT	1320
GlyAspLysIleTrp	ValPheAspGluAla	SerLeuGluProGly	TyrProLysHisIle	
385	390	395	400	

【配列表 7】

配列番号：2（つづき）

AAGCACCTGGGGCGA	GGGCTCCCTACCCAC	AAGATTGATGCTGCT	CTCTTCTGGATGCC	1380
LysGluLeuGlyArg	GlyLeuProThrAsp	LysIleAspAlaAla	LeuPheTrpMetPro	
405	410	415	420	
AATGGAAAGACCTAC	TTCTTCCGTGAAAC	AACTACTACCGTTTC	AACGAAGAGCTCAGG	1440
AsnGlyLysThrTyr	PhePheArgGlyAsn	LysTyrTyrArgPhe	AsnGluGluLeuArg	
425	430	435	440	
GCACCTGGATAGCGAG	TACCCCAAGAACATC	AAAGTCTGGAAAGGG	ATCCCTGAGTCTCCC	1500
AlaValAspSerGlu	TyrProLysAsnIle	LysValTrpGluGly	IleProGluSerPro	
445	450	455	460	
AGACGGCTCATTCTAG	GGCAGGGATGAACTC	TTCACTTACTTCTAC	AAGGGGAACAAATAC	1560
ArgGlySerPheMet	GlySerAspGluVal	PheThrTyrPheTyr	LysGlyAsnLysTyr	
465	470	475	480	
TGGAAATTCAACAAAC	CAGAACCTGAAGCTA	GAACCGGGCTACCCC	AACTCAGCCCTGAGG	1620
TrpLysPheAsnAsn	GlnLysLeuLysVal	GluProGlyTyrPro	LysSerAlaLeuArg	
485	490	495	500	
GAATGGATGGGCTGC	CCATCGGGAGGCCGC	CCGGATGAGGGGACT	GAGGAGGAGACGGAG	1680
AspTrpMetGlyCys	ProSerGlyGlyArg	ProAspGluGlyThr	GluGluGluThrGlu	
505	510	515	520	
GTGATCATCATTGAG	GTGGACGGAGGAGCCC	GGCGGGGGCGGTGAGC	GGGGCTGCCGTGGTG	1740
ValIleIleGlu	ValAspGluGluGly	GlyGlyAlaValSer	AlaAlaAlaValVal	
525	530	535	540	
CTGCCCCGTGCTGCTG	CTGCTCCTGGTGCTG	GGGGTGGGCTTGCA	CTCTTCTTCTTCAGA	1800
LeuProValLeuLeu	LeuLeuValLeu	AlaValGlyLeuAla	ValPhePhePheArg	
545	550	555	560	
CCCCATGGACCCCC	AGCCGACTGCTCTAC	TGCCACCGTTCCCTG	CTGGACAAGGTCTGA	1860
ArgHisGlyThrPro	ArgArgLeuLeuTyr	CysGlnArgSerLeu	LeuAspLysVal...	
565	570	575	580	
CCCCCATCCCCGGG	CCGCCCCACTCCTACC	ACAAGGACTTTGCCT	CTGAAGGCCAGTGGC	1920
AGCAGGTGGTGGTGG	CTGGGCTGCTCCCAT	CGTCCCAGCCCCCT	CCCCGGAGCCTCCTT	1980

〔配列表 8 〕

配列番号：2 (つづき)

CCTTCTCTGTCCC CTGGCTGGCTCCTT CACCCCTGACCCCTC CCTCCCTCCTCCCCC 2040
 GGCATTGCATCTTCC CTAGATAGGTCCCCCT GAGGGCTGAGTGAGGA GGGGGGGCCCTTCCA 2100
 GCCTCTGCCCTCAG GGGAAACCCCTGACTGCTTGTCTGCTGCTGAGC CCCATCTGAATGTCT 2160
 TGGGGGCTCTGCACT TGAAGGCAGGACCCCT CAGACCTCGCTGGTA AAGGTCAAATGGGT 2220
 CATCTGCTCCTTTTC CATCCCCTGACATAC CTTAACCTCTGAACCT CTGACCTCAGGAGCC 2280
 TCTGGGAACTCCAG CCCTGAAAGCCCCAG GTGTACCCAATTGGC ACCCTCTCACTACTC 2340
 TTTCTGGCTAAAAGG AATCTAATTTGTTG AGGGTAGAGACCCCTG AGACAGTGTGAGGG 2400
 GTGGGGACTGCCAAG CCACCCCTAAGACCTT GGGAGGAAACTCAG AGAGGGTCTTCGTTG 2460
 CTCAGTCAGTCAACT TCCTCGGAGATCTTC CTCTGCCCTCACCTAC CCCAGGGAACTTCCA 2520
 AGGAAGGAGCCTGAG CCACTGGGACTAAG TGGGCAGAAGAAACC CTTGGCAGCCCTG 2580
 CCTCTCGAATGTTAG CCTTGGATGGGCTT TCACAGTTAGAAGAG CTGAAACCAGGGTG 2640

【配列表 9】

配列番号：2（つづき）

CAACCTCTCACCGTAGG CTGGGGGGGGTGGGA GAGGGGGGGTCAGA CCCCTGGGGGTGACC 2700
 CTTAAGCCCCACAGAG AAAGAACCTTCCCCA AACTCAGGCAGCTGG GGCTGAGGCCAAAC 2760
 GCAGAACACCCAGAG GGGGCAGGAGGGGAC CAAAAGGAAAATGA GGACGTGCAGCAGCA 2820
 TTGGAAGGCTGGGC CCGGCAGCCAGCTTA AAGCTAACAGGGGC CATCAGGGTGGGCTT 2880
 GTGGAGCTCTCAGGA AGGGCCCTGAGGAAG GCACACTTGCTCCTG TTGGTCCCTGTCCCTT 2940
 GCTGCCCAAGGCAGGG TGGAGGGGAAGGGTA GGGCAGCCAGAGAAA GGACCAAGAGAAGCCA 3000
 CACAAACGAGGAATG AGGGCCTTCACGAGA GCCCACAGGGCTGG CTGGCCACGCTGTCC 3060
 CGGCCTGCTCACCAT CTCAGTGAGGGACAG GAGCTGGGCTGCTT AGGCTGGTCCACGC 3120
 TTCCCTGGTCCCAGC ACCCCTCAAGCCTGT CTCACCAAGTGGCCTG CCCTCTCGCTCCCCC 3180
 ACCCAGCCCCACCCAT TGAAGTCTCCTTGGG TCCCAAAGGTGGCA TGCTACCGGGGACTT 3240
 GGGAGAGTGAGACCC AGTGGAGGGAGCAAG AGGAGAGGGATGTGG GGGGGTGGGGCACCG 3300
 CTACGGGAATGGGG TGAACGGTGCTGGCA GTTCGGCTAGATTTC TGTCTTGTITGTIT 3360
 TTTCTTTCTTTAAT GTATATTTTATTAT AATTATTATATAT

【配列表 1 0】

配列番号：3

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp

1 5

【配列表 1 1】

配列番号：4

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu

1 5

【配列表 1 2】

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CC(C/A)(C/A)G(G/A/C)TG(T/C)(C/G) G(G/A/C)(G/A)(A/T)(G/C/T)CC(T/A)CA

【配列表 1 3】

配列番号：6

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

((T//C)TC(G//A)T(G//C)(G//C)TC(G/A) TC(G/A)AA(G/A)TG(G/A)(G/A)
(C/A/T)(G/A)TC(T/C)

【配列表 1 4】

配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Val	Leu
1														15
Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Phe	Phe	Phe
														25

【配列表 1 5】

配列番号：8

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg	Glu	Val	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Arg	Glu	Gly	His	Glu	Lys
1													10

【配列表 16】

配列番号：9

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly Glu Met
1 5 10

【配列表 17】

配列番号：10

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Pro Ser Gly Gly
1 5 10 15

請 求 の 範 囲

1. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。
2. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA。
3. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含むし、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミド。
4. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。
5. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

20

25

Fig. 1

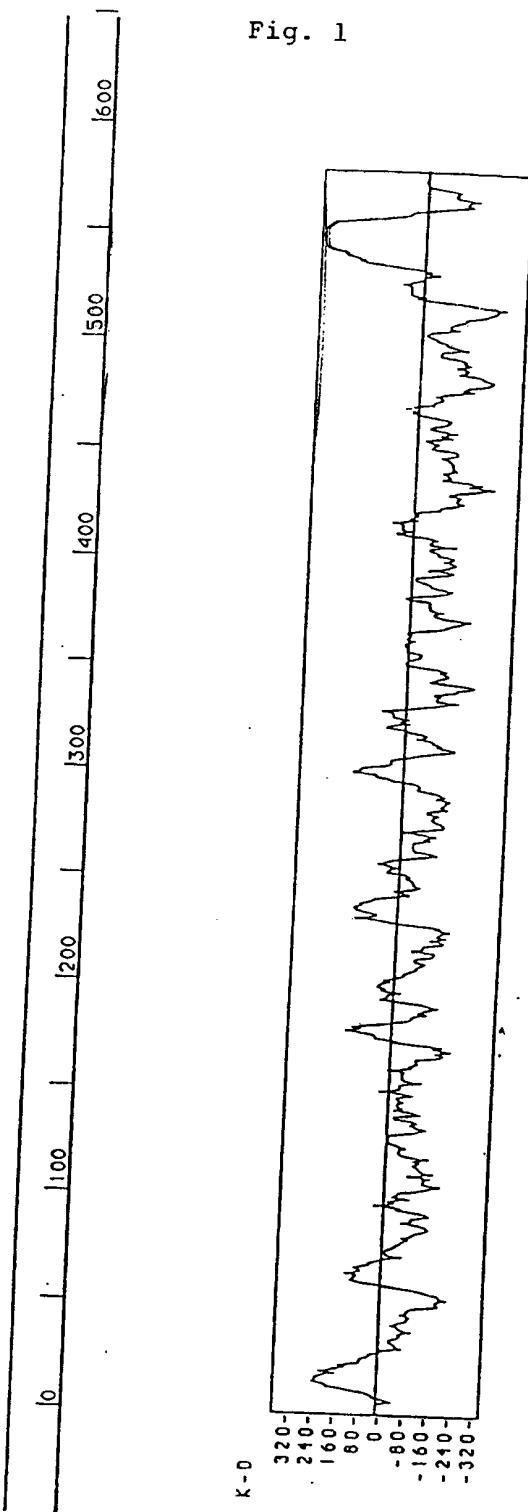


Fig. 2A

2/15

Fig. 2B

MMP-11	LRPPRCGVPD	PSDGLSARN	RQKRFVLSGG	RWEKTDLTYR	ILRFPWQLVQ	123
MMP-1	MKQPRCGVPD	VAQ-FVL..	...TE-GNP	RWEQTHLTYR	IENYTPDLPR	127
MMP-8	MKKPRCGVPD	SGG-FML..	...TP-GNP	KWERTNLTYR	IRNYTPQLS	126
MMP-10	MRKPRCGVPD	VGH-FSS..	...FP-GMP	KWRKTHLTYR	IVNYTPDLPR	126
MMP-3	MRKPRCGVPD	VGH-FRT..	...FP-CIP	KWRKTHLTYR	IVNYTPDLPK	127
MMP-9	MRTPRCGVPD	LGR-FQT..	...FE-GDL	KWHHHNITYW	IQNYSEDLPR	134
MMP-2	MRKPRCGNPD	VAN-YNF..	...FP-RKP	KWDKNQITYR	IGYTPDLDP	108
MMP-7	MQKPRCGVPD	VAE-YSL..	...FP-NSP	KWTSKVVTYR	IVSYTRDLPH	122
MT-MMP	MRRPRCGVPD	KFGAEIKANV	RRKRYAIQGL	KWQHNEITFC	IQNYTPKVGE	137
Consensus	MRKPRCGVPD	.VG..F...	...FP-C.P	KW..T.LTYR	I.NYTPDLP.	150
MMP-11	EQVRQTMAEA	LKVWSDVTPL	TFTEV...	HEGRADI	MIDFARYWDG	165
MMP-1	ADVDHAIKEKA	FQLWSNVTPL	TFTKV...	SEQQADI	MESFVRGDDHR	169
MMP-8	AEVERAIKDA	FELWSVASPL	IFTRI...	SQGEADI	NEAFYQORDHG	168
MMP-10	DAVDSAIEKA	LKVWEEVTPL	TFSLR...	YEGEADI	MISFAVKEHG	168
MMP-3	DAVDSAVEKA	LKVWEEVTPL	TFSLR...	YEGEADI	MISFAVREHG	169
MMP-9	AVIDDAFARA	FALWSAVTPL	TFTRV...	YSRDADI	VQQFGVAEHG	176
MMP-2	ETVDDDAFARA	FQWWSDVTPL	RFSLR...	HDGEADI	MINFQRWEHG	150
MMP-7	ITVDRLLVSKA	LNMGKEIPL	HFRKV...	VWGTADI	MIGFARGAHC	164
MT-MMP	YATYEAIRKA	FRWVESATPL	RREVPPYAYI	REGHEKQADI	MIFFAEGFHG	187
Consensus	..VD.A..KA	F.VWS.VTPL	TF.RV...	..EG.ADI	MI.FA...HG	200

Fig. 2C

MMP·11	DDLPFDGPGG	ILAHAFFPKT	HREGDVHFDY	DETWTIGDDQ	CTD	208
MMP·1	DNSPFDGPGG	NLAHAFQPGP	GIGGDAHFDE	HERWTNNFT	EYN	211
MMP·8	DNSPFDGPGC	ILAHAFQPGQ	GIGGDAHFDA	EETWTNTSA	NYN	210
MMP·10	DFYSFDGPGH	SLAHAYPPGP	GLYGDIHFDD	DEKWTEDAS	CTN	210
MMP·3	DFYPFDGPGN	VLAHAYAPGP	GINGDAHFDD	DEQWTKDTT	CTN	211
MMP·9	DGYPFDGKDG	LLAHAFPPGP	GIQGDAHFDD	DELWSLGKG	VVVPTTRFGNA	225
MMP·2	DGYPFDGKDG	LLAHAFAPGT	GVGGDSHFD	DELWTLCEG	QVVRVKYGN	199
MMP·7	DSYPFDGPGN	TLAHAFAPGT	GLGGDAHFDE	DERWTDGSSL	GIN	207
MT·MMP	DRTAFDCEGG	FLAHAYFPGP	NIGGDTHFD	AEPWTVRNE	DLN	229
Consensus	D. YPFDCPGG	.LAHAF. PGP	GIGGDAHF	DE.WT.	..N	250
MMP·11	208
MMP·1	211
MMP·8	210
MMP·10	210
MMP·3	210
MMP·9	DGAACHFPFI	FEGRSYSACT	TDGRSDGLPW	CSTTANYDTD	DRFGFCPSER	275
MMP·2	DGEYCKFPFL	ENGKEYNSCT	DTGRSDGFLW	CSTTYNFEKD	QKYOFCPHEA	249
MMP·7	207
MT·MMP	229
Consensus	300

Fig. 2D

MMP-11		208				
MMP-1		211				
MMP-8		210				
MMP-10		210				
MMP-3		210				
MMP-9	LYTRDGNADG	KPCQFPFIFO	QOSYSACTTD	GRSDGYRWCA	TTANYDRDKL	211
MMP-2	LFTMGGNAEG	QPCKFPFRFQ	GTSYDSCTTE	GRTDGYRWCG	TTEDYDRDKK	325
MMP-7						299
MT-MMP						207
Consensus						229
						350
MMP-11						208
MMP-1						211
MMP-8						210
MMP-10						210
MMP-3						210
MMP-9	FGFCPTRADS	TVMGGNSAGE	LCVFPFTFLG	KEYSTCTSEG	RGDGRLWCAT	211
MMP-2	YGFCPETAMS	TVGG-NSEGAA	PCVFPFTFLG	NKYESCTSAG	RSBGGKMWCAT	375
MMP-7						348
MT-MMP						207
Consensus						229
						400

Fig. 2E

6/15

MMP-11	QPW	PTVTSRTPAL	GPOAGCIDNE	IAPLEPDAPP	291	
MMP-1		RSQNPVQP·I	GPQTP·.....	KAC	278	
MMP-8		·LSSNP·I	QPTGP·...ST	P·...KPC	279	
MMP-10		P·PASTEEP·L	VPTKS·...VP	S·CSEMPAKC	289	
MMP-3		P·PPDSPETP·L	VPTEP·...VP	P·EPGTPANC	290	
MMP-9		PPTVHPSERP	GPTGPPTA·G	PSTAT·...TV	PLSPVD·DAC	516
MMP-2		TAGPTGPPSA	PSTAT·...TV	LGTGP·...TP	TLGPVTPPEIC	440
MMP-7	267
MT·MMP		PTYGPNICDG	NFDTVAMLRG	EMFDFKKRWF	WVRVNNQVNID	361
Consensus	PT·...P·...	GYPMPIGQFW	361
				PT·...P·...	550
MMP-11	STIR·GELEFF	FKAGFVWRLR	GGQL·QPGYP	ALASRHWQGL	339	
MMP-1	DS·KLTFDI	TTIR·GEVMF	FKDRFYMR·T	NPFY·PEVEL	NFTSVFWPQL	324		
MMP-8	DP·SLTFDAI	TTLR·GEILF	FKDRYFWR·R	HPQL·QRVEM	NFISLFWPSL	325		
MMP-10	DP·ALSFDAI	STLR·GEYLF	FKDRYFWR·R	SHWN·PEPEF	HLISAFWPSL	335		
MMP-3	DP·ALSFDAV	STLR·GEILI	FKDRHFWR·K	SLRK·LEPEL	HLISSFWPSL	336		
MMP-9	NV·NI·FDI	AEIG·NQLYL	FKDGKYWRFS	EGRGSRPQGP	FLIADKWPAL	563		
MMP-2	KQ·DIVFDGI	AQIR·GEIFF	FKDRFIWRTV	TPRD·KPMGP	LLVATFWPEL	487		
MMP-7	267		
MT·MMP	RGLPASINTA	YERKDGKFVF	FKGDKHWVFD	EASLEPGYPK	HIKELGRG·L	410		
Consensus	D·...·FDI	T·R·GE·..·F	FKDR·.WR·..	L·S·FWP·L	600		

Fig. 2F

Fig. 2G

MMP·11	P· SPVDAAFE	·DAQGHIWFF	QGAQYWWYDG	EKPVLG· · · P	APL·TELGIV	383
MMP·1	P· NGLEAAYE	FADRDEVRFF	KGNKYWAQG	QNVLHG· · · YP	KDIYSSFGFP	371
MMP·8	P· TGIQAAYE	DFDRDLIFLF	KGNQYWAQSG	YDILQG· · · YP	KDI·SNYGFP	371
MMP·10	P· SYLDAAYE	VNSRDTVFF	KGNEFWAIRG	NEVQAG· · · YP	RCI·HTLGFP	381
MMP·3	P· SGVDAAYE	VTSKDLVFF	KGNQFWAIRG	NEVRAG· · · YP	RCI·HTLGFP	382
MMP·9	P· RKLDGVFE	EPLSKKLFFF	SGRQVWWYTG	ASV·LG· · · P	RRL·DKLGLG	607
MMP·2	P· EKIDAVYE	APQEEKAVFF	AGNEYWIYSA	STLERG· · · YP	KPL·TSLGLP	533
MMP·7	· · · · ·	· · · · ·	· · · · ·	· · · · ·	· · · · ·	267
MT·MMP	P· TDKIDAAFL	WMPNGKTYFF	RGNKYYRFNE	ELRAVDSYEP	KNIKVWECIP	460
Consensus	P· · · DAAYE	· · · · · FF	GN.YW· · · G	· · · G· · YP	· I· · · LG· P	650
MMP·11	R· · FPVHAAL	WVGPEKNIY	FFRGRDYWRF	HPSTRRVDSP	VPRRATDWRG	431
MMP·1	RTVKHIDAAL	S· EENTGKY	FFVANKYWRY	DEYKRSMDPG	YPKMIAHDFP	420
MMP·8	SSVQAIDAAV	F· · YRSKTY	FFVNDQFWRY	DNQRQFMMEPG	YPKSIISGAPP	418
MMP·10	PTIRKIDAAV	S· DKEKKKTY	FFAADKYWRF	DENSQSMEQG	FPRLIADDFP	430
MMP·3	PTVRKIDAAI	S· DKEKNKTY	FFVEDKYWRF	DEKRNSMEPG	FPKQIAEDFP	431
MMP·9	ADVAQVTGAL	R· · SGRGM· L	LFSGRRLWRF	DVKAQMVDPY	SASEVDRMFP	655
MMP·2	PDVQRVDAAF	N· WSKNKKTY	IFAGDKFWRY	NEVKKKMDPG	FPKLIADAWN	582
MMP·7	· · · · ·	· · · · ·	· · · · ·	· · · · ·	· · · · ·	267
MT·MMP	ESPRGSFM· G	SDEVFTYFYK	GNKYWKENNQ	KLKVEPGYPK	SALRDWMGCP	509
Consensus	· V· · · DAA·	· · · · · KTY	FF· · · K· WR·	D· · · · · M· PG	P· · · I· · · FP	700

Fig. 2H

MMP·11	VPSE···IDAA	FQDADGYAYF	LRGRLYWKFD	PVKVKALEGF	PRLV···	473
MMP·1	GIGH···KVDA	V···FMKDGF	···YF·FH	GTRQYKFDPK	TKRILTLQ···	458
MMP·8	GIES···KVDA	V···FQQEHHF	···HV·FS	GPRYYAFDLI	AQRVTRVA···	456
MMP·10	GVEP···KVDA	V···LQAFGFF	···YF·FS	GSSQFEFDPN	ARMVTHIL···	468
MMP·3	GIDS···KIDA	V···FEEFGFF	···YF·FT	GSSQLEFDPN	AKKVTHTL···	469
MMP·9	GVPL···DTHD	VFOYREKAYF	···CQDR·FY	WRVSSRSELN	QVDQVGYV···	697
MMP·2	AIPD···NLDA	VVDLQGGG···	···HS·YF	FKGAYYLKLE	N·QSLKSVKF	621
MMP·7	···	···	···	···	···	267
MT·MMP	SGGRPDEGTE	EETEVIIIEV	DEEGGGAVSA	AAVVLPPVLL	LLVLAVGLAV	559
Consensus	G···	DA	V···	F···	···F.	···
						750
MMP·11	···GPD·FFG	CAE···PA	NTFLX···	···	···	489
MMP·1	···KANSWFN	CR···	KN	···	···	469
MMP·8	···RGNKWLN	CRY···	GX	···	···	468
MMP·10	···KSNSWLH	C···	···	···	···	476
MMP·3	···KSNSWLN	C···	···	···	···	477
MMP·9	···TYD·ILQ	CPE···DX	···	···	···	708
MMP·2	GSIKSD·WLG	C···	···	···	···	631
MMP·7	···	···	···	···	···	267
MT·MMP	FFFRRHGTPR	RLLYCQRSLL	DKV	···	···	582
Consensus	···	WL.	C	···	···	796

Fig. 3

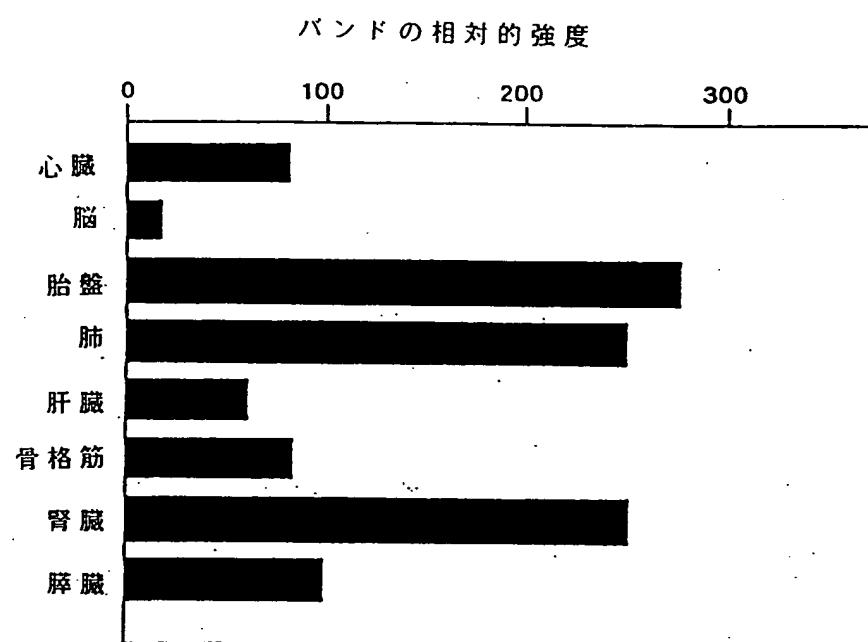


Fig. 4

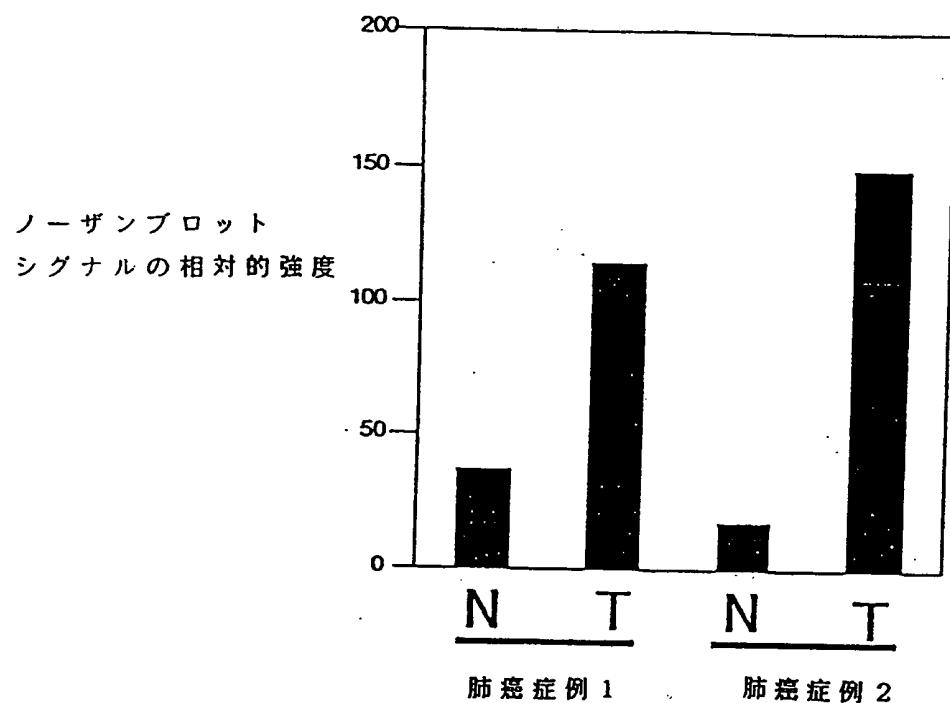


Fig. 5

MT-MNP cDNAによる
トランスフェクション
の有無 抗 体

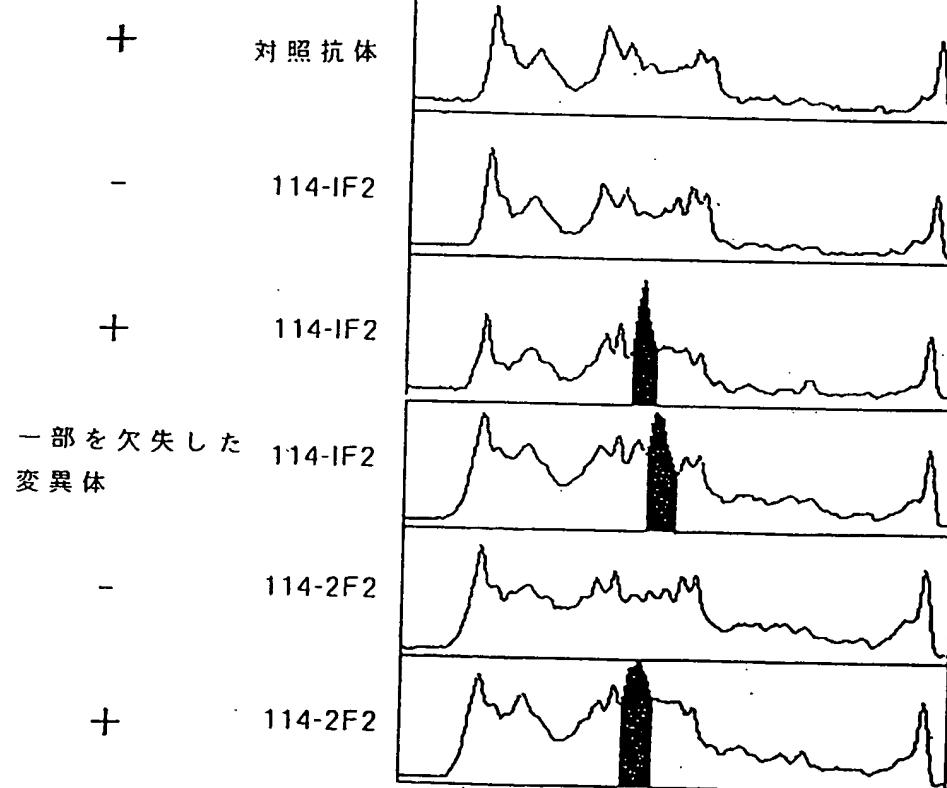


Fig. 6

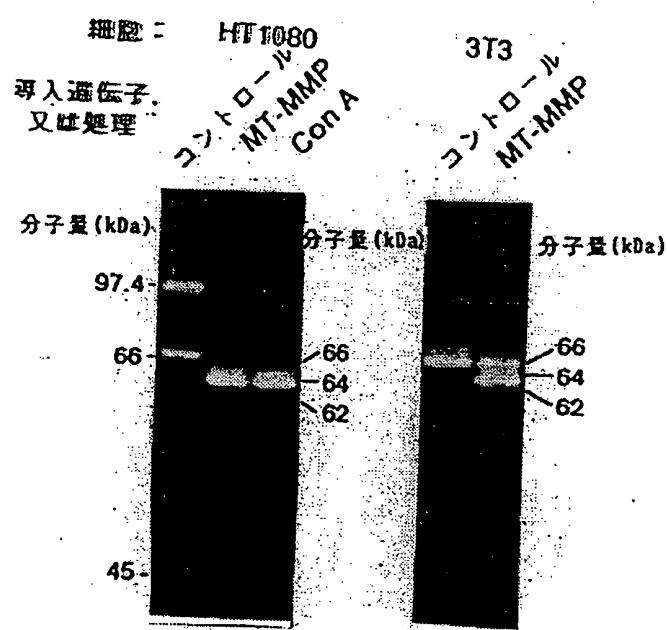


Fig. 7

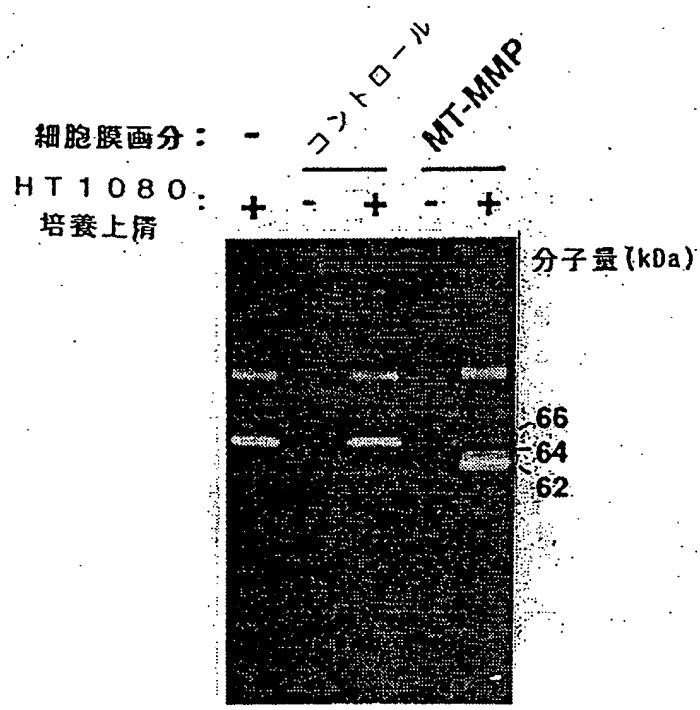
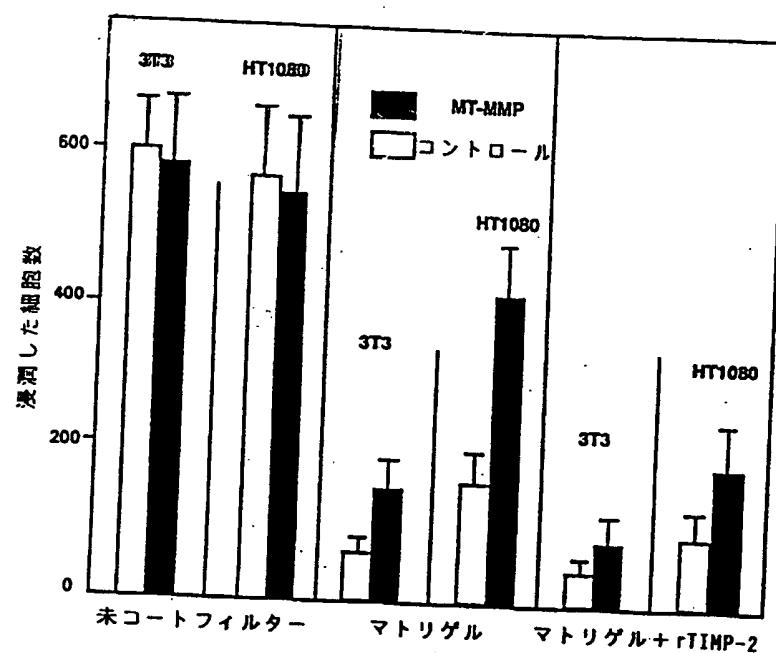


Fig. 8



〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATI
NAL RECOGNITION OF THE DEPOSITS OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） 富士薬品工業株式会社
寄託者 代表取締役社長 竹田 雄一郎
あて名 ⑨33
富山県高岡市長慶寺53番地

殿

I. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）
マスク由来单クローン性抗ヒト膜結合型マトリックスメクロプロテアーゼ
(MT-MMP) 抗体産生ハイブリドーマ (114-2F2)

(受託番号)
FERM BP- 4743

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 6年 7月 14日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）にI欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Science and Human-Technology
Agency of Natural Science and Technology
所 長 鈴木 修
Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県
1-3. Higashi 1 chome Isukuba-shi Ibaraki-ken
1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)
305. JAPAN

平成 6年 (1994) 7月 14日

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N9/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12N9/50-9/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search: (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREWIEWS, WPI, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Nature, Vol. 370, No. 6484, July 7, 1994 (07. 07. 94), Hiroshi Sato et al. "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells" P. 61-65	1-5
A	Journal of Cancer Research Clinical Oncology, Vol. 117, No. 2, (1991), M. Siadat Pajour et al. "Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer" P. 144-150	1-5

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search January 20, 1995 (20. 01. 95)	Date of mailing of the international search report February 7, 1995 (07. 02. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94/02009

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁶ C12N9/64

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁵ C12N9/50-9/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREWIEWS, WPI, CAS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Nature , 第370巻, 第6484号, 7. 7月. 1994 (07. 07. 94), Hiroshi Sato et al. 「A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells」 p. 61-65	1-5
A	Journal of Cancer Research Clinical Oncology , 第117巻, 第2号, (1991), M. Siadat Pajour et al. 「Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer」 p. 144-150	1-5

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
 の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために
 引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
 又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
 がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20. 01. 95	国際調査報告の発送日 07.02.95
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 佐伯裕子 電話番号 03-3581-1101 内線 3449 4 B 9 1 5 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

